

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22420110153619

廈門大學

博 士 学 位 论 文

对虾白斑综合症病毒(WSSV)不同毒力株分析, 及病毒结构蛋白 VP95 的功能

Analysis of White Spot Syndrome Virus virulence and the function of structure protein VP95

高美玲

指导教师姓名: 杨 丰 研究员

朱小明 副教授

专 业 名 称: 海洋生物学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 6 月

2014 年 5 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(对虾病害研究)课题(组)的研究成果,获得(杨丰)课题(组)经费或实验室的资助,在(国家海洋局第三海洋研究所生物重点)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

(☒)2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

目 录

摘 要	I
Abstract.....	III
前 言	1
1 对虾白斑综合症病毒及其分子生物学研究.....	1
1.1 对虾白斑综合症病毒的研究概况.....	1
1.2 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究.....	4
1.3 对虾白斑综合症病毒的蛋白质组学研究.....	9
1.4 对虾白斑综合症病毒毒力的研究.....	12
1.5 毒力基因的研究.....	13
2 甲壳动物免疫系统研究概况.....	13
2.1 虾的免疫系统.....	13
2.2 血淋巴细胞及其在免疫防御中的功能.....	14
2.3 体液免疫.....	14
3 本论文的研究内容、目的和意义.....	16
第一部分：不同毒力 WSSV 分离株的筛选.....	18
1 前言.....	18
2 材料和方法.....	18
2.1 材料.....	18
2.2 方法.....	19
3 结果.....	21
3.1 不同病毒株感染对克氏原螯虾致病性存在显著差异.....	21
3.2 克氏原螯虾体内不同病毒株的增殖.....	21
3.3 不同病毒株感染红螯螯虾.....	24
3.4 不同组织中病毒的增殖.....	25
4 讨论.....	26
第二部分：不同毒力 WSSV 分离株对红螯螯虾免疫因子的影响.....	28
1 前言.....	28
2 材料和方法.....	28

2.1 材料.....	28
2.2 方法.....	29
3 结果.....	32
3.1 宿主对不同病毒株的免疫反应.....	32
3.2 高毒株和中毒株引起血淋巴细胞的快速凋亡.....	36
3.3 高毒株和中毒株引起血淋巴组织和造血组织细胞快速死亡.....	38
4 讨论.....	39
第三部分：对虾白斑综合症病毒毒力基因筛选.....	43
1 前言.....	43
2 材料和方法.....	43
2.1 材料.....	43
2.2 方法.....	44
3 结果.....	49
3.1 基因组序列分析.....	49
3.2 基因组序列比对.....	50
3.3 同源重复区的差异.....	57
3.4 系统发育树.....	57
3.5 缺失 ORFs 在 High Five 中表达.....	59
3.6 造血组织细胞中不同病毒株的增殖.....	61
4 讨论.....	62
第四部分：结构蛋白 VP95 在病毒包装中的作用.....	65
1 前言.....	65
2 材料和方法.....	65
2.1 材料.....	65
2.2 方法.....	66
3 结果.....	72
3.1 Vp95 表达时序的分析.....	72
3.2 重组蛋白的克隆表达及纯化.....	73
3.3 抗体特异性分析.....	74

3.3 VP95 自身聚合.....	75
3.5 电镜观察病毒.....	76
3.6 VP95 的免疫金标定位.....	78
3.7 vp95-dsRNA 对病毒的增殖及其包装的干扰	81
4 讨论.....	82
参考文献	86
附录 1 图片	99
附录 2 WSSV-CN01, -CN02 和-CN03 基因组编码 ORFs.....	105
研究生期间发表的文章	114
致谢	115

Contents

Chinese abstract.....	I
English abstract	III
Introduction	错误!未定义书签。 1
1 White spot syndrome virus (WSSV) and molecular biological research.....	错误!未定义书签。
1.1 Research of white spot syndrome virus	1
1.2 Genomics of white spot syndrome virus.....	4
1.3 Proteomics of white spot syndrome virus.....	9
1.4 Study on WSSV virulence	12
1.5 Study on virulence genes	错误!未定义书签。
2 Research of crustacean immune system	13
2.1 Immune system of shrimp.....	13
2.2 Haemocyte and its function in immune defense system.....	14
2.3 Humoral immunity	14
3. Contents, purpose and significance of this thesis	16
Part 1 Define of WSSV strains in different virulence level	18
1 Introduction.....	18
2 Materials and methods	18
2.1 Materials	18
2.2 Methods.....	19
3 Results.....	21
3.1 <i>Procambarus clarkii</i> infected with WSSV strains	21
3.2 Replication of WSSV strains in <i>Procambarus clarkii</i>	21
3.3 <i>Cherax quadricarinatus</i> infected with WSSV strains.....	24
3.4 Replication of WSSV strains in different tissues	25
4 Discussion	26
Part 2 WSSV strains of different virulence induce distinct immune response in <i>Cherax quadricarinatus</i>	28
1 Introduction.....	28
2 Materials and methods	28
2.1 Materials	28

2.2 Methods.....	29
3 Results.....	32
3.1 Host immune response against WSSV strains	32
3.2 High- and moderate-virulent WSSV strains induced rapid haemocyte death.....	36
3.3 High- and moderate-virulent WSSV strains induced rapid cell death of primary haematopoietic tissue cells and haemocytes	38
4 Discussion	39
Part 3 Screening of virulence-related genes in WSSV genome.....	43
1 Introduction.....	43
2 Materials and methods	43
2.1 Materials	43
2.2 Methods.....	44
3 Results.....	49
3.1 Analysis of genomic sequences	49
3.2 Alignment of genomic sequences	50
3.3 Differences in homology regions.....	57
3.4 Phylogenetic analysis.....	57
3.5 Expression of missing ORFs in High Five cells	59
3.6 Replication of WSSV strains in haematopoietic tissue cells	60
4 Discussion	61
Part 4 The function of structural protein VP95 in viral assembly.....	65
1 Introduction.....	65
2 Materials and methods	65
2.1 Materials	65
2.2 Methods.....	66
3 Results.....	72
3.1 Transcriptional analysis of <i>vp95</i>	72
3.2 Purification of recombinant protein His-VP95-M200	73
3.3 Analysis of the polyclonal antibodies	74
3.4 VP95 self-interaction	75
3.5 Observation of virions under transmission electron microscope.....	76
3.6 Localization of VP95	78

3.7 RNA interference	80
4 Discussion	82
References	86
Appendix 1 Pictures	99
Appendix 2 ORFs sencoded by WSSV-CN01, -CN02 and -CN03....	104
Pubications	113
Acknowledgements	114

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘 要

对虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是一种严重危害对虾养殖业发展的病原。本研究通过人工感染螯虾活体实验,筛选得到三株(高毒株 WSSV-CN01, 中毒株 WSSV-CN02 和低毒株 WSSV-CN03)毒力差异较大的病毒株。利用 Real-time PCR 分析了不同毒株在螯虾体内的复制情况,发现毒株毒力高低与病毒的增殖量无相关性。高毒株和中毒株感染的螯虾血淋巴细胞数量显著低于低毒株感染组和对照组。进一步实验证明,血淋巴细胞数量下降有两方面原因:(1) WSSV 感染能引起血淋巴细胞死亡;(2) WSSV 感染可能破坏造血组织,影响造血功能。不同毒株感染后,螯虾血淋巴中血蓝蛋白含量无显著差异,酚氧化酶活性和过氧化物酶活性存在显著差异。

为了洞悉造成不同病毒株毒力差异的分子机制,三株病毒(WSSV-CN01, -CN02 和 -CN03)的全基因组序列被测定。通过序列比对,与高毒株相比,低毒株和中毒株中分别缺失了 18 个和 12 个基因,其中包括四个囊膜蛋白基因和一个极早期基因。体外实验证明,低毒株入侵原代造血组织细胞能力减弱。低毒株和中毒株缺失基因在昆虫细胞 High Five 中表达,发现其中四个基因可能影响细胞分裂。

结构蛋白 VP95 在病毒囊膜和核衣壳中均有分部,能自身形成二聚体和三聚体。经高盐溶液处理,核衣壳中大部分的 VP95 脱落,同时溶液变得黏稠。电镜观察高盐处理的核衣壳,其形态依然保持杆状,平端完整,只是在圆端出现一个门户(portal),并且病毒遗传物质 DNA 从这个门户喷出。免疫金标定位发现,VP95 就位于门户处。进一步研究显示 VP95 也定位在完整病毒粒子的类尾结构内,而类尾结构与基因组喷发的门户处于同一端。根据这些实验证据,我们推导了 VP95 的功能:VP95 在核衣壳的圆端形成了一个供遗传物质导出的门户,由 VP95 聚合体形成的一个“塞子”结构,将门户塞住,而且这个“塞子”的延伸部分经囊膜包裹形成了类尾结构。另外, RNAi 实验证明,转染 vp95-dsRNA 影响了细胞中 vp95 的转录水平,干扰了子代病毒粒子产生。

总之,开展病毒毒力与免疫防御之间关系的研究是了解病毒致病机理的重要

依据，毒力基因的筛选和确定有助于更好的预防和控制病毒性疾病的爆发；对病毒结构蛋白功能的研究也有助于揭示病毒的组装机制。

关键词： 对虾白斑综合症病毒；毒力；结构蛋白

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

White spot syndrome virus is one of the pathogens that seriously obstructed the development of the shrimp aquaculture. In this study, three WSSV strains (high-virulent, WSSV-CN01; moderate-virulent, WSSV-CN02; low-virulent, WSSV-CN03) in distinct virulence level were isolated. The results of real-time PCR suggested that the virulences of different strains are not correlated to the viral replication *in vivo*. Moreover, the total haemocyte counts of WSSV-CN01- and -CN02-infected group were significantly lower than WSSV-CN03-infected group or the negative control group. There may be two reasons for the decline of total haemocyte counts: (1) cell death induced by WSSV infection; (2) WSSV infection damages the haematopoietic tissue and affect the haematopoietic function. The activity of phenoloxidase and peroxidase were varied in different strains infected groups. However, the haemocyanin concentration was stayed in the same level in all experimental groups.

In order to study the mechanism of different virulences, the whole genomes of the three WSSV strains in different virulence level were sequenced. Genomic alignment revealed that 19 and 13 ORFs were absent in the low-virulent strain and moderate-virulent strain compared with the high-virulent strain, including four envelop protein genes and one immediate-early gene. The capability of low-virulent strain was diminished in invading the primary haematopoietic tissue cells. Of the deleted genes in low-virulent and moderate-virulent strain, four gene expressions can affect High Five cell division.

Structural protein VP95 exists in both viral capsid and envelop that can form homotrimer and homodimer. VP95 could be removed to supernatant and the suspension become viscous simultaneously when nucleocapsid treated with high-salt buffer. The extrusion of genomic DNA from a hole of nucleocapsid could be observed under electron microscope. Notably, the genomic DNA ejection was always located at the round end of the nucleocapsid but not the flat end. After genome ejection, the shape of nucleocapsid still kept intact with a hole at the round end. VP95 was located at the round end of the nucleocapsid analyzed with immune gold labeling experiment. Further evidence suggested that VP95 also exist inner the tail-like structure. The

tail-like structure and the hole in the nucleocapsid are at the same end of the virion. All these data suggest that VP95 form a portal to mediate the extrusion of genomic DNA. Additionally, the VP95 may function as a plug-like protein to block up the portal and prevent genome ejection. The plug extends out and wrapped with envelop proteins forming the tail-like structure. Post-transcriptional gene silencing can be triggered by *vp95* sequence-specific double-stranded RNA. Almost no progeny virus can be observed in cells transfected with *vp95*-dsRNA under transmission electron microscopy.

In conclusion, studies on the relationship of viral virulence and shrimp immunity are significantly important for elucidation of viral pathogenesis. Screening of virulence-related genes provides scientific evidence for prevention and control of the disease. The study on the function of structural protein can help to understand the mechanism of viral assembly.

Key words: white spot syndrome virus, virulence, structural protein

前 言

1 对虾白斑综合症病毒及其分子生物学研究

1.1 对虾白斑综合症病毒的研究概况

上世纪九十年代对虾养殖业大面积爆发流行病,给全球对虾养殖业造成了巨大的经济损失。经研究证明,引起该病的病原是对虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)。该病毒宿主范围广、传染力强、致死率高,是全球范围内限制对虾养殖产业发展的最主要因素之一。为了防治该病毒的爆发,研究人员对 WSSV 展开了深入的研究。早期,研究者从病原学、病理学以及流行病学等方面对 WSSV 的特性进行了研究,随后又建立了多种实用性强、灵敏度高的病原检测方法,为病害的预防和控制起到了关键的作用。WSSV 全基因组的测序完成成为 WSSV 的深入研究奠定了基础,从此拉开了分子病毒学研究的序幕。

1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现及其命名

自 1993 年以来,我国南部和亚洲其他沿海国家的对虾养殖场大面积、大范围爆发流行病,造成养殖对虾的大规模死亡。随后,该病迅速蔓延到了南北美洲和欧洲等地的养殖场,严重制约了全球对虾养殖业的发展。染病后期的对虾在头胸甲部位出现大量白斑,因此称这种病为对虾白斑综合症^[1, 2]。

自此,不同地区的水产业内人士和科技人员纷纷对该病的病原体进行研究,发现对虾白斑综合症的病原是一种新型的非包涵体型类杆状病毒。不同研究者根据分离病毒株的地域分布、原始宿主、形态发生以及主要的病理症状对病原体进行了命名。随后经过序列比对,发现不同地域(中国、印度、美国、泰国)分离的病毒 DNA 序列之间差异不大^[3]。之后的深入研究也表明,各地发现的病原体之间差异不大,因此将这种类杆状病毒统一命名为白斑综合症病毒。

1.1.2 对虾白斑综合症病毒的形态结构

WSSV 是一种类杆状的非包涵体病毒。在电子显微镜下观察,不同分离株的病毒粒子及核衣壳的大小均不同,即使相同地域相同宿主中分离到的病毒大小亦有差异,但形态结构十分相似^[4-7]。完整病毒粒子呈椭圆状,并带有一条细长的类尾结构。病毒粒子长约 210-380 nm,宽约 70-167 nm。病毒的结构主要由囊膜(Envelope)和核衣壳(Nucleocapsid)构成。病毒粒子的囊膜是由双层膜结构以及中间的间质构成,有些学者认为类尾结构其实是囊膜的延伸。病毒的核衣壳位于囊膜内部,大小约 180-420 nm×54-85 nm。负染的核衣壳一端钝圆,称为圆端,另一端为平头,称为平端。核衣壳表面由 14-19 个沿长轴排列的结构单元组成,内部包裹着病毒遗传物质 DNA。图 1-1 展示了 WSSV 病毒的结构。

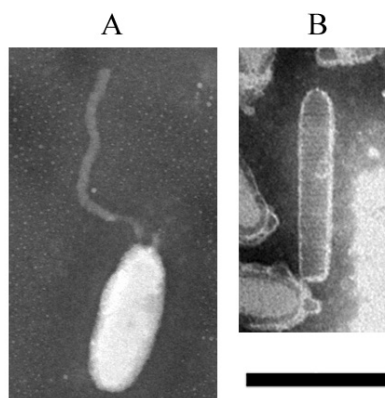


图 1-1 对虾白斑综合症病毒结构

A.完整病毒颗粒; B.核衣壳 (标尺为 200nm)

Fig. 1-1 The structure of white spot syndrome virus

A. Intact virion; B. nucleocapsid (Bar=200nm)

1.1.3 对虾白斑综合症病毒的感染宿主和实验室动物模型

WSSV 的宿主范围十分广泛,在甲壳纲(软甲壳亚纲、桡足亚纲)和昆虫纲动物中均有其敏感宿主^[4, 8-14],软甲壳亚纲动物宿主多为十足目的种类,并以虾

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库